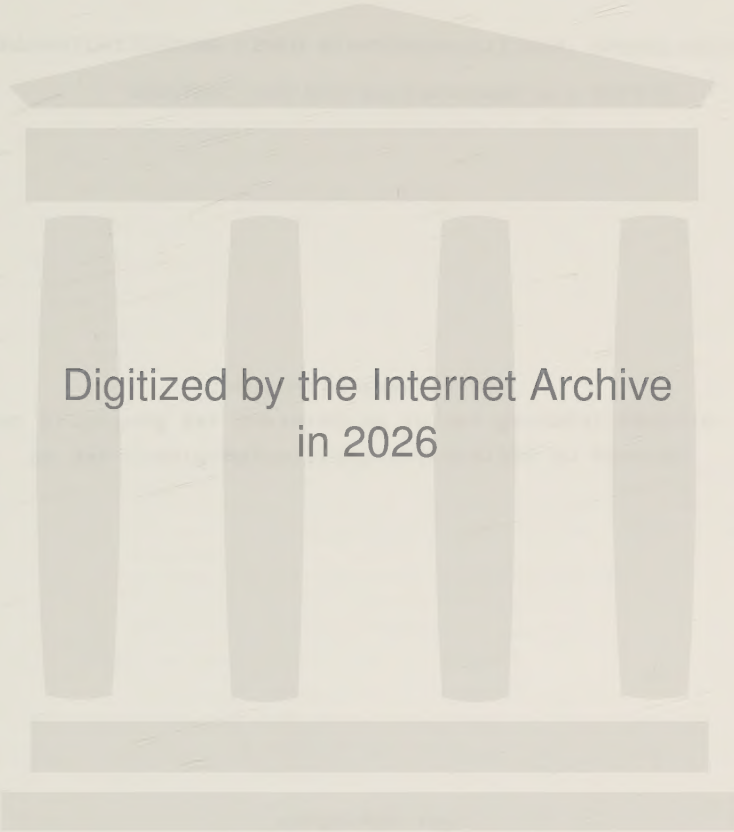


**CHARAKTERISIERUNG EINER NINHYDRINPOSITIVEN,  
HYDROLYSIERBAREN SUBSTANZ  
AUS DEM KALBSMYOKARD ALS PEPTID.**

**Constantin Baran**

**1979**





Digitized by the Internet Archive  
in 2026

[https://archive.org/details/IA41551912\\_0023](https://archive.org/details/IA41551912_0023)



Aus der Internen Poliklinik der Universität München

Direktor: Professor Dr. W. Zöllner

---

CHARAKTERISIERUNG EINER NINHYDRINPOSITIVEN, HYDROLYSIERBAREN  
SUBSTANZ AUS DEM KALBSMYOKARD ALS PEPTID.

Inauguraldissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin  
an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Constantin Baran  
aus Winhöring

München 1979

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

|                      |                      |
|----------------------|----------------------|
| Berichterstatter:    | Prof. Dr. H. Nowy    |
| Mitberichterstatter: | Prof. Dr. N. Zöllner |
| Dekan:               | Prof. Dr. W. Spann   |

Tag der mündlichen Prüfung: 27.11.1979



## Inhaltsangabe:

### A. Einleitung

### B. Methodik

- I. Extraktgewinnung
- II. Trennungungsverfahren
  - 1. Filtration
  - 2. Hochspannungselektrophorese
    - a) Apparatur
    - b) Färbeverfahren
  - 3. Dünnschichtchromatographie
- III. Elution
- IV. Gefriertrocknen
- V. Hydrolyse
- VI. Analyseverfahren
  - 1. Ionenaustauschchromatographie
  - 2. Infrarotspektroskopie

### C. Ergebnisse

- I. Reingewinnung von Peptid A aus dem Kalbsherzultrafiltrat
  - 1. Suche nach Peptid A in verschiedenen gelchromatographischen Fraktionen mittels Hochspannungselektrophorese
  - 2. Quantitative Trennung von Peptid A
  - 3. Elution und Gefriertrocknung
  - 4. Kontrolluntersuchungen
- II. Analyse des isolierten Peptid A
  - 1. Ergebnis der Infrarotspektralanalyse
  - 2. Aminosäurezusammensetzung
- III. Versuche mit human. Mischserum und Extrakten aus menschl. Organen (Herz, Leber, Psoas)
  - 1. Filtration
  - 2. Gefriertrocknen
  - 3. HE-phoretische Untersuchungen

### D. Diskussion

### E. Zusammenfassung



## A. Einleitung

Eine Vielzahl der im menschlichen Organismus vorkommenden Peptide und anderer niedermolekularer Stoffe sind identifiziert und hinsichtlich ihrer Funktion aufgeklärt. Als Beispiel seien hier nur die Hormone der Hypophyse und des Pankreas erwähnt. Nur wenige Peptide wurden bisher im Herz- und Skelettmuskelgewebe untersucht. Gerade beim Herzmuskel wäre, angesichts des hohen Anteils der Herzerkrankungen an Morbidität wie Mortalität in den hochentwickelten Zivilisationen, die genaue Kenntnis im Stoffwechsel wirksamer Peptide interessant.

Nach Vorarbeit von K. Kothny (3) und S. Donhauser (4) in diesem Labor gelang es H. Schmück (2) 1972 mit Hilfe der Hochspannungselektrophorese und Dünnschichtchromatographie aus dem niedermolekularen Kalbsherzextrakt ein Peptid zu isolieren, das Peptid A genannt wurde. Als Bestandteile des Peptid A wurden Taurin, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Leucin, Alanin, Glycin und Serin oder Valin gefunden.

F. Haiß (1) trennte 1973 mit den im wesentlichen gleichen Methoden ebenfalls Peptid A aus dem niedermolekularen Kalbsherzextrakt, fand aber als Bestandteile Colaminphosphat, evtl. Colamin und einen dritten Stoff, bei dem es sich wahrscheinlich um ein Abbauprodukt von Colaminphosphat handelt.

In der vorliegenden - von 1973 - 1976 durchgeführten - Arbeit wurde neben der Hochspannungselektrophorese, Dünnschicht- und Ionenaustauschchromatographie die Methode der Infrarotspektroskopie angewandt, um die unterschiedlichen Ergebnisse über die Bestandteile von Peptid A, die von H. Schmück und F. Haiß erarbeitet wurden, zu klären.

Außerdem wurde untersucht, ob sich eine, dem Peptid A entsprechende, Bande auch im Pherogramm vom niedermolekularen Extrakt des menschlichen Herzens, Psoasmuskels, der menschlichen Leber und im humanen Mischserum findet.

## B. Methodik

### I. Extraktgewinnung

Das für die Untersuchungen verwendete Material vom Kalbsmyocard wurde aus den übriggebliebenen Beständen der Versuchsreihe von F. Haiß (1) übernommen. Die Methode der Extrakterstellung und Enteiweißung wird in seiner Inaugural-Dissertation beschrieben (B I, S. 3).

Der auf die gleiche Weise hergestellte Extrakt der zu untersuchenden menschlichen Organe (Herz, Leber, Psoas) lag ebenfalls fertig für die Trennungsversuche vor.

### II. Trennungsmethoden

#### 1. Filtration

Die Filtration ist eine einfache Methode Substanzgemische, deren Bestandteile in Flüssigkeiten oder Gasen gelöst sind, nach der Größe der Partikel aufzutrennen.

Im Versuch sollten Substanzen bis zum Molekulargewicht 500 untersucht werden. Dazu wurde die Diaflo Membran UM 05 (Amicon) verwendet. Sie besteht aus einer 0,1 bis 1,5  $\mu$  starken Oberflächenschicht mit Poren von 2 bis 100 Å Größe, an der die eigentliche Trennung erfolgt, und aus einer 50 bis 250  $\mu$  starken unteren Schicht aus porösem, durchlässigem Material.

Die Filtration wurde bei einem Überdruck von maximal 7 kg/cm<sup>2</sup> durchgeführt (Gerät der Firma Amicon). Zu starke Eindickung des Überstandes wurde durch Nachgießen von destilliertem Wasser, ein Verkleben der Membran durch einen eingebauten Magnetrührer, der die zu filtrierende Flüssigkeit bewegte, vermieden.

#### 2. Hochspannungselektrophorese

##### a. Apparatur

Die Wanderung in Lösung befindlicher geladener Teilchen unter Einwirkung eines elektrischen Feldes ist das Prinzip der Elektrophorese. Das Anlegen einer hohen Spannung ermöglicht die Auftrennung niedermolekularer Substanzen wie Peptide und Aminosäuren.

Das Max-Planck-Institut für Biochemie, München entwickelte ein Gerät (Hersteller: Fa. Hölzl, München), das Elektrophoresen bei Spannungen bis zu 10 000 V ermöglicht, d. i. bei 1 m Kammerlänge 100 V/cm. Die entstehende Joule'sche Wärme wird durch ein Kühlaggregat, das die Temperatur der Kupferplatte, die den Boden der Trennkammer bildet, reguliert. Die auf ca. + 2°C gekühlte, von einer Kunststoffolie überzogene, Kupferplatte stellt die Auflagefläche des Trägermaterials dar. Dazu diente Filterpapier (Schleicher & Schüll, Nr. 2043 b, Streifenbreite 28 cm), das zuvor 48 Stunden im Aqua dest.-Bad gewaschen und anschließend in Puffer getränkt wurde. Kathode und Anode sind in Pufferwannen getaucht, die über Filterpapierbrücken mit den Enden des Trägerpapiers überlappen.

Es wurde ein Essigsäurepuffer, pH 1,9 mit der Zusammensetzung Essigsäure : Ameisensäure : Wasser = 12 : 2,6 : 85,4 verwendet.

#### b. Färbeverfahren

Die Färbung wurde mit Ninhydrin vorgenommen, wodurch außer Aminosäuren und Peptiden u. a. auch Amine, Ammoniak, Aminoaldehyde, Zucker und Allantoin dargestellt werden können.

Die Zusammensetzung des Ninhydrinreagens: 0,3 g Ninhydrin, 1 ml Pyridin, 1 ml Eisessig auf 100 ml Aceton.

Die etwa zwei Stunden lang bei Zimmertemperatur getrockneten Pherogramme wurden zweimal durch die Färbelösung gezogen und anschließend 3 Min. in den auf 105°C erhitzten Trockenschrank gelegt.

Die Banden erscheinen nach dieser Methode in verschiedenen Blautönen auf ungefärbtem Untergrund und verblassen nach einigen Tagen.

### 3. Dünnschichtchromatographie

Zur Kontrolle der Reinheit der isolierten Substanz und zum Identitätsvergleich der zur Analyse bestimmten mit der ursprünglich isolierten Substanz, fand diese zusätzliche Trennungsmethode Verwendung.

Das Prinzip der Methode ist die Wanderung von Teilchen in

einer feuchten Kammer. Dazu wurden DC Kieselgelplatten F 254, 5 x 20 cm, der Fa. Merck, und als Fließmittel eine Phenolharz-Wasser-Mischung (75 g geschmolzenes Phenol : 25 ml Wasser) verwendet. Die zu trennenden Substanzen wurden an der Grundlinie in 2 cm Entfernung vom unteren Rand der Kieselgelplatte punktförmig durch wiederholtes Auftupfen der Polyäthylenkapillaren aufgetragen, bis zu einer Fleckehengröße von 4 mm Durchmesser.

Die Chromatographiekammer wurde an drei Seiten mit Filterpapier ausgekleidet, 1 cm hoch mit Fließmittel gefüllt und - nach dem Hineinstellen der Kieselgelplatte mit der Auftraglinie am unteren Ende - dicht verschlossen. Nach 7 bis 8 Stunden wurden die Platten der Kammer entnommen, 15 min bei 90°C getrocknet, mit Ninhydrin-Collidin-Lösung (Zusammensetzung: 0,2 g Ninhydrin, 30 ml Eisessig, 4 ml Collidin auf 100 ml n-Butanol) besprüht und nochmals 2 - 3 Minuten bei 90°C getrocknet. Auf ungefärbtem Untergrund erschienen bräunlich-violette Flecken, die erst nach mehreren Tagen verblaßten.

### III. Elution

Die Gewinnung der erwünschten Substanz aus dem Elektrophoresepapier gelang so:

Vor dem Anfärben schnitt man den luftgetrockneten Pherogrammen an beiden Längsseiten je einen 1 cm breiten Streifen ab, färbte diese und markierte durch Wiederanlegen der Streifen an das Pherogramm die Lage der gesuchten Substanz. Dieser Bereich wurde herausgeschnitten und bis zur Elution im Gefrierschrank aufbewahrt. Die Nachkontrolle erfolgte durch Anfärben des Pherogrammrestes.

Vorbereitend zur Elution wurde ein Bogen Filterpapier 48 Stunden in Aqua dest. gewaschen, der nachher so in eine Wanne, die mit Aqua dest. gefüllt ist, gelegt wird, daß ein Längsrand in das Wasser taucht, der zu Zacken zugeschnittene über den Wannenrand unter das Niveau des Wasserspiegels zu hängen kommt, wo er einem Glasstab aufliegt. An die Zacken wurden die Elektrophoresestreifen 1 cm überlappend angehängt. Das untere Ende ragt in 50 ml Kolben. Das Filterpapier in der Wanne wirkt

dabei als Heber und saugt über Kapillarkräfte das Wasser in die auszuwaschenden Streifen, von denen die Substanz in die Kolben tropfenweise gespült wird. Die Tropfgeschwindigkeit betrug 10 Tropfen/Minute, die Dauer der Elution 1 Stunde. Das Anfärben der abgeschnittenen unteren Streifenhälfte zeigt den Erfolg der Elution.

#### IV. Gefriertrocknen

Die Konzentration des Eluats ist über das Verfahren der Gefriertrocknung oder des Rotationsverdampfens möglich. Wegen der großen Eluatmengen wurden die Methoden kombiniert. Das auf ein kleines Volumen im Rotationsverdampfer eingeeengte Material wurde anschließend lyophilisiert.

Dazu wurde eine selbstgebaute mit Methanol/Trockeneis und einer Hochvacuumpumpe betriebene Einrichtung benutzt.

#### V. Hydrolyse

Zur Zerlegung von Peptiden in ihre Bestandteile wird am häufigsten die hydrolytische Spaltung mittels starker Säuren angewandt. Die Hydrolyse wurde im Institut für klinische Chemie der Universität München vorgenommen und ist in der Dissert. von F. Haiß (1) (B IV, S. 10) beschrieben.

#### VI. Analyseverfahren

##### 1. Ionenaustauschchromatographie

Die Bestimmung der Aminosäuren im Hydrolysat wurde nach dem Prinzip der Ionenaustauschchromatographie mit dem Gerät Multichrom (Fa. Beckmann) und mit einem, auf dem gleichen Analyseprinzip beruhenden sog. Durrumgerät derselben Firma mit vielfach höherer Empfindlichkeit, durchgeführt.

Die Versuche mit diesem Gerät fanden unter den gleichen Bedingungen, wie sie bei F. Haiß (1) beschrieben sind, im Institut für klinische Chemie der Universität München statt. (Dissert. F. Haiß (1), B V, S. 10).

## 2. Infrarotspektroskopie

Neben der Ultraviolett-, kernmagnetischen Resonanz- und Massenspektroskopie ist die Infrarotspektroskopie eine der spektroskopischen Methoden, die zur Lösung von Problemen in der organischen Chemie herangezogen wird.

Bei der IR-Spektroskopie wird der Umstand ausgenutzt, daß die Energie der meisten Molekülschwingungen im infraroten Bereich des elektromagnetischen Spektrums liegt. Die für die organische Chemie brauchbarsten Schwingungen liegen im engeren Bereich von 2,5 bis 15  $\mu$  oder durch die reziproke Wellenlänge ausgedrückt im Bereich von 4000 bis etwa 667  $\text{cm}^{-1}$ . Von der großen Zahl von Schwingungsmöglichkeiten, an denen ein komplexes Molekül teilnimmt, sind einige dieser Schwingungen auf Einzelbindungen oder funktionelle Gruppen beschränkt (lokalisierte Schwingungen), während andere als Schwingungen des ganzen Moleküls aufgefaßt werden müssen (Gerüstschwingungen).

Die lokalisierten Schwingungen sind von Interesse, denn sie dienen zur Identifizierung funktioneller Gruppen.

Die Gerüstschwingungen eines Moleküls verursachen Absorptionsbanden bei relativ niedriger Energie (unterhalb 1500  $\text{cm}^{-1}$ ) und führen zu Überschneidungen mit Banden von Fundamentalschwingungen.

Ein IR-Spektrum besteht demnach aus 2 Bereichen: Oberhalb 1500  $\text{cm}^{-1}$  können die Absorptionsbanden funktionellen Gruppen zugeordnet werden, während unterhalb 1500  $\text{cm}^{-1}$  viele Banden das Molekül als Ganzes charakterisieren (sog. "finger-print"-Region), weil darin die Identität einer Substanz mit einer authentischen Probe zuverlässig festgestellt werden kann).

Das Spektrometer (Modell 237 der Fa. Perkin Elmer) besteht aus einer Lichtquelle, die den gesamten Frequenzbereich des Instruments (4000 bis 600  $\text{cm}^{-1}$ ) ausstrahlt. Diese Strahlung wird in zwei Lichtbündel gleicher Intensität aufgeteilt, von denen eines durch die zu messende Probe tritt. Fällt nun eine Schwingungsfrequenz der Moleküle in der Probe in den Bereich zwischen 4000 und 600  $\text{cm}^{-1}$ , können die Moleküle Energie dieser Frequenz aus dem Licht absorbieren. Das Spektrum wird deshalb durch Vergleich der Intensitäten der beiden Lichtbündel aufgenommen, nachdem eines die Probe passiert hat. Die Wellenlänge

wird mit Hilfe eines Prismas verändert.

Der Versuch läuft automatisch so ab, daß die Banden auf dem Spektrum nach unten zweigen, d. h. Absorption gegen Wellenlänge aufgetragen ist.

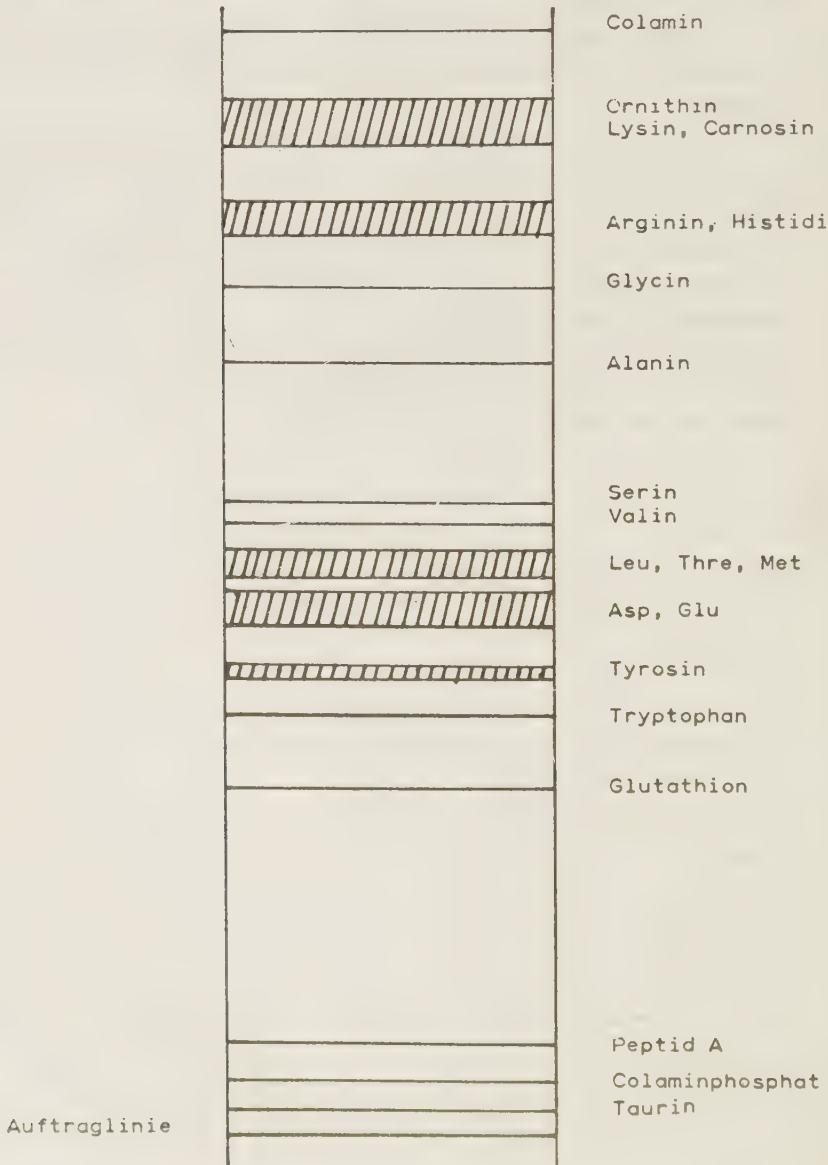
Es ist möglich Verbindungen in der Gasphase, als reine Flüssigkeit, in Lösung und wie in unserem Fall in festem Zustand zu messen.

Die zu untersuchende Substanz wird in einem Mörser mit der etwa 100-fachen Menge KBr, das keine zusätzlichen IR-Spektren erzeugt, pulverisiert und dabei gemischt. Das Pulver wird in eine Preßform gegeben, die mittels einer hydraulischen Presse 3 Minuten einem Druck von 10 Tonnen/cm<sup>2</sup> bei gleichzeitig erzeugtem Vakuum ausgesetzt wird.

Die 0,6 mm starken Preßlinge werden in einer Haltevorrichtung dem Meßstrahl vorgesetzt. Sie sind bei entsprechender Aufbewahrung beliebig oft verwendbar.

Pherogramm

Übersicht über ninhydrinpositive Substanzen im Kalbsherzextrakt.  
 pH 1,9 - kV 6,5 - 180 min (aus der Diss. von F. Haß, Abb. Nr. 9)  
 Zahlreiche dazwischen liegende schwache Banden wurden weggelassen.



## C. Ergebnisse

### I. Reingewinnung von Peptid A aus dem Kalbsherzultrafiltrat

#### 1. Suche nach Pept. A in verschiedenen gelchrom. Fraktionen mittels Hochspannungselektrophorese

Von dem übriggebliebenen Material der gelchromatographischen Untersuchungen (Sephadex G 10) mit Kalbsherzultrafiltrat, die von F. Haß vorgenommen wurden, wurden die Fraktionen, die die gesuchte Bande enthielten und natives Kalbsherzultrafiltrat, das nicht gelchrom. getrennt worden war, für die Isolierung verwendet.

#### 2. Quantitative Trennung von Peptid A

Das Volumen des Ausgangsmaterials betrug insgesamt  $3,5 \text{ cm}^3$  bei unbekannter Konzentration. Die Auftrennung erfolgte in 17 Gängen bei einer Laufzeit von jeweils 4 Stunden, pH 1,9 und 6,5 kV Spannung. Die aufgetragene Menge pro Pherogramm betrug  $200 \mu\text{l}$ . Nach der Trennung wurde, auf die in B III beschriebene Weise, die Lage der Peptid A Bande ausfindig gemacht. Die angefertigten Kontrollfärbungen ergaben, daß nach dem Ausscheiden etwa 10 % des getrennten Peptid A wegen des nicht immer linearen Verlaufs der Bande verloren gingen.

#### 3. Elution und Gefriertrocknung

Die aus den Pherogrammen geschnittenen Streifen wurden mit der in B III geschilderten Methode ausgewaschen. Insgesamt wurden 650 ml eluiert. Die Elutionszeit betrug 1 Stunde und die Tropfengeschwindigkeit 10 Tropfen/Min. Nach der Gefriertrocknung (Beschreibung in B IV) hafteten hauchdünne weiße Beläge an den Kolbenwänden. Sie wurden mit 2 ml Aqua dest. gelöst und zum leichteren Herauskratzen auf eine kleine Fläche konzentriert.

#### 4. Kontrolluntersuchungen

Um die Reinheit des isolierten Peptid A zu kontrollieren, wurde etwas Substanz in  $100 \mu\text{l}$  Aqua dest. gelöst, davon  $50 \mu\text{l}$  he-phoretisch und  $50 \mu\text{l}$  dünnschichtchrom. getrennt. Statt nur einer Bande fanden sich im Pherogramm außer der Peptid A Bande noch 3 Banden. Dieses Ergebnis wurde von der dünnschichtchr. Untersuchung bestätigt. Daraufhin wurde die gesamte Substanz

ein zweites Mal mittels HE-Phorese getrennt, eluiert und getrocknet. Die Kontrolle ließ danach noch die Colaminphosphatbande unter der Peptid A-Bande erkennen. Der 3. Trenngang ergab schließlich eine einzige Bande.

Zur Prüfung der Identität dieser Bande mit dem ursprünglich gesuchten Peptid A wurde je eine Probe hochspannungselektrophoretisch und dünnschichtchrom. zusammen mit noch nicht aufgetrenntem Ultrafiltrat getrennt.

Im Pherogramm lag das isolierte Peptid A in einer Linie mit der Peptid A-Bande des Ultrafiltrates.

Im Dünnschichtchromatogramm ergab das isolierte Peptid A einen  $R_f$ -Wert von 0,27 (Laufzeit 7 h 20 min, Fließmittelfront 13,3 cm, Zimmertemperatur).

Peptid A war somit isoliert; die übriggebliebene Menge Reinsubstanz wog 350  $\mu\text{g}$ .

## II. Analyse des isolierten Peptid A

### 1. Ergebnisse der Infrarotspektalanalyse

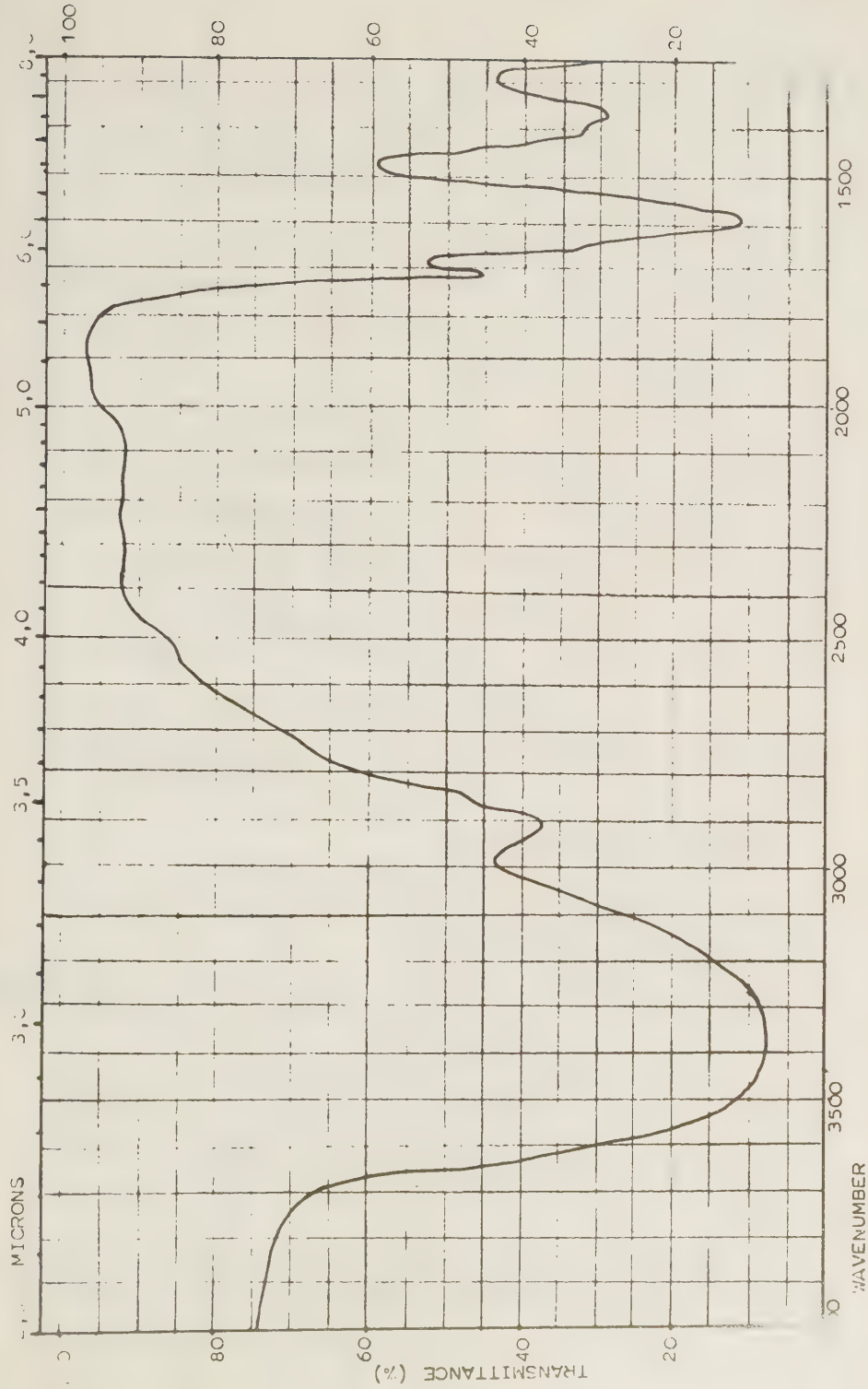
Wegen der geringen Substanzmenge wurden anstatt der üblichen Tabletten (1,5 mg zu analys. Substanz auf 250 mg Kaliumbromid) sogenannte Mikropreßlinge hergestellt. Dabei erwiesen sich ca. 30  $\mu\text{g}$  auf 50 mg KBr als zu wenig Substanz, erst 100  $\mu\text{g}$  Peptid A auf 50 mg KBr ergaben ein verwertbares Spektrogramm.

Bei der mittleren Trommelgeschwindigkeit von 6 7/8 min pro Wellenbereich wurden Spektrogramme innerhalb der Wellenzahlbereiche 4000 - 1280  $\text{cm}^{-1}$  und 2000 - 630  $\text{cm}^{-1}$  aufgezeichnet. Die Lichtspaltbreite wurde auf die größtmögliche Weite eingestellt.

Die Spitzen der Absorptionsspektren lagen bei folgenden Wellenzahlbereichen: 3400, 2920, 1720, 1590, 1380, 1260, 1050, 800  $\text{cm}^{-1}$ . Die Banden der "fingerprint"-Region (unterhalb 1500  $\text{cm}^{-1}$ ) sind wegen der Ober- und Kombinationsschwingungen (s. B. VI, 2) zur Strukturanalyse des Moleküls nicht geeignet. Dazu wurden die Banden bei 3400, 2920, 1720, 1590  $\text{cm}^{-1}$  herangezogen.

IR-Spektrogramm:

Sample: Peptid A, Origin: Kalbsmuskard, Solvent: KBr, Conc.: 50 mg/ca. 100 µg,  
Scan speed: med., Slit: 7



Ihre Bedeutung im Einzelnen:

Absorptionsspitze bei

Funktionelle Gruppe:

Wellenzahlbereich:

3400  $\text{cm}^{-1}$

1. Möglichkeit:

Wasserstoff-Brückenbindg.:

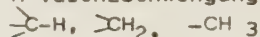


2. Möglichkeit:

N-H-Valenzschwingung bei  
primären Aminen

2920  $\text{cm}^{-1}$

C-H-Valenzschwingung:



1720  $\text{cm}^{-1}$

Carbonylabsorption bei  
sekundären Aminen  $\text{O}=\text{C}-\text{NH}-$

1590  $\text{cm}^{-1}$

Amid I (C=O-Valenzschwingung)

Amid II (N-H-Bendingschwingung;  
wird nur in offenkettigen  
Amiden gefunden)

## 2. Aminosäurezusammensetzung

Die gefriergetrocknete Reinsubstanz (100  $\mu\text{g}$ ) wurde in 2,5 ml Aqua dest. gelöst und in der Weise hydrolysiert, auf die im Abschnitt B, V hingewiesen wurde.

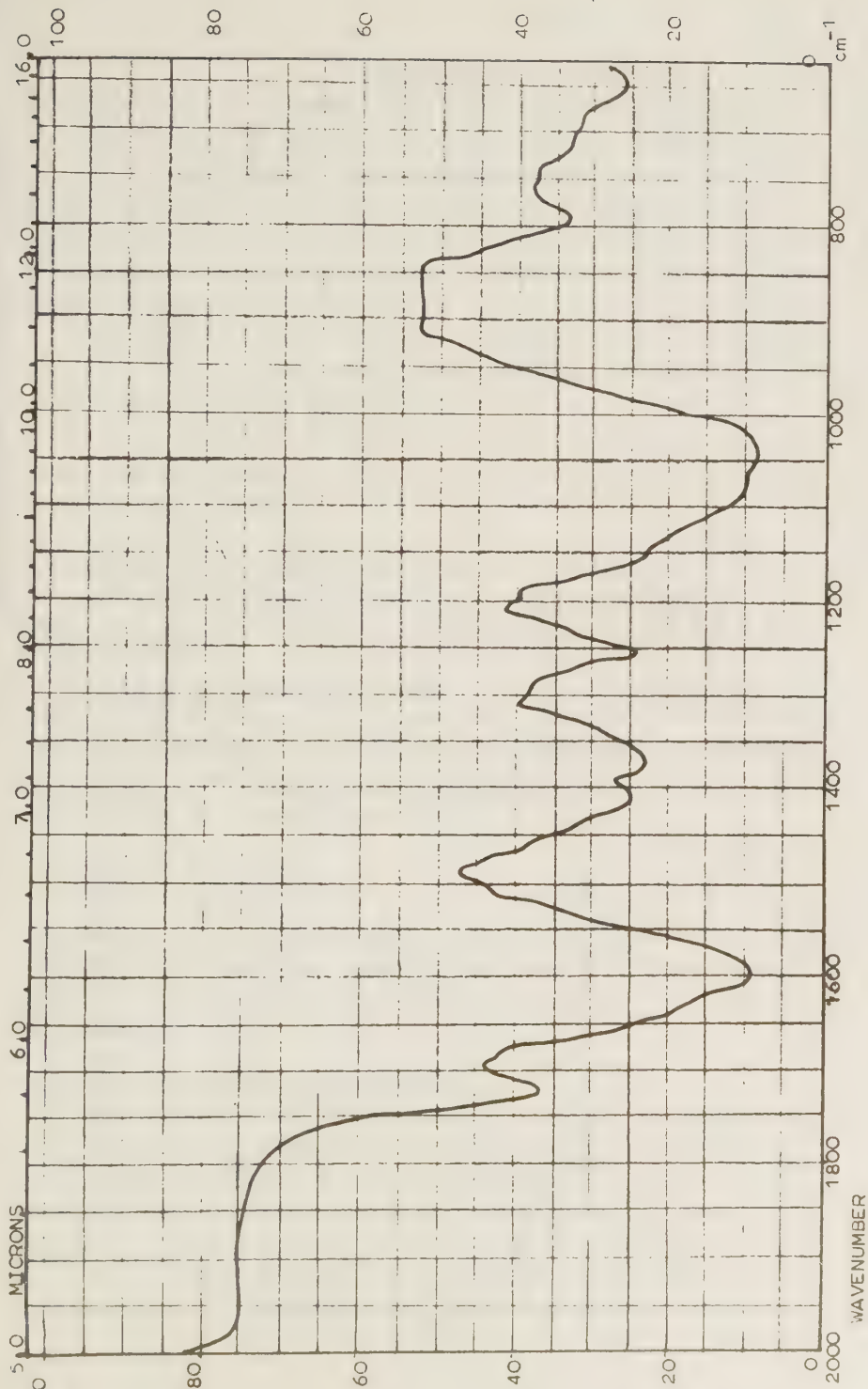
0,1 ml Hydrolysat wurden mit 1 ml standardisiertem Auftragspuffer gemischt, davon 3/5 (= 60  $\mu\text{g}$  Substanz) in den Analysator Abschnitt B, VI, 1) eingespritzt.

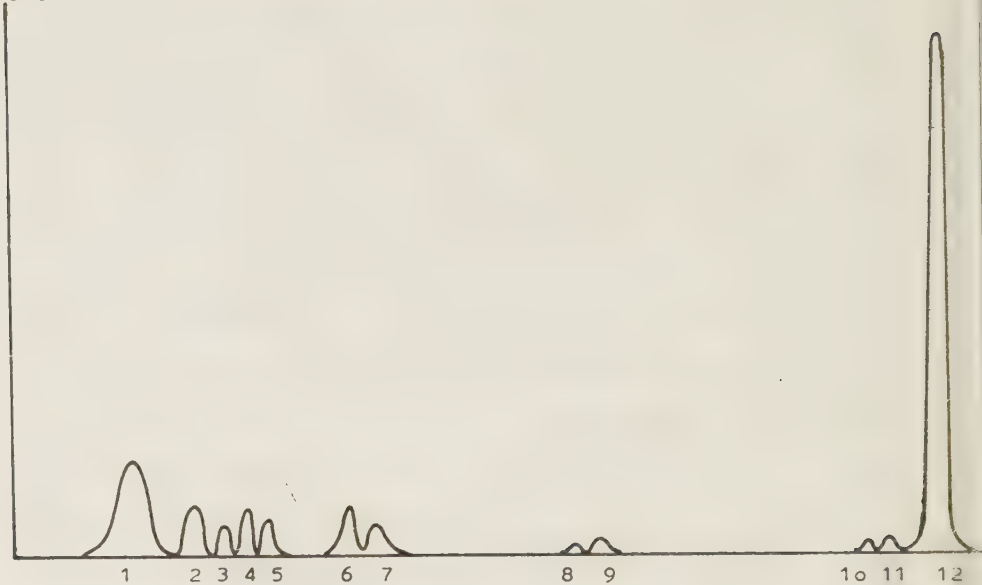
Für die Analyse mit dem Beckmann Durrumgerät wurde ein Hydrolysat aus 60  $\mu\text{g}$  Trockensubstanz, die aus dem Preßling (für die Infrarotspektroskopie) mittels Zermörserung, HE, Elution, Gefriertrocknen gewonnen wurde, verwendet.

Ergebnis:

Der Schreiber zeichnete auf dem Durchlaufbogen 12 Peaks auf, davon waren 11 mittels Vergleichssubstanzen bekannten Stoffen

IR-Spectrogramm: Sample: Peptid A, Origin: Kalbsmyokard, Solvent: KBr, Conc.: 50 mg/ca. 100 ug,  
Scan speed: med., Slit: 7



Ionenaustauschchromatogrammlg E<sub>570</sub>

fer: ----- pH 3,22 ----- pH 4,05 ----- pH 6,28 -----

| Peak-Nr.: | Substanz                   | Flächenanteil (%) |
|-----------|----------------------------|-------------------|
| 1         | x = Taurin, Col und Col-Ph | 34,6              |
| 2         | Asp                        | 12,0              |
| 3         | Thr                        | 5,8               |
| 4         | Ser                        | 9,2               |
| 5         | Glu                        | 8,6               |
| 6         | Gly                        | 12,9              |
| 7         | Ala                        | 5,9               |
| 8         | Ileu                       | 1,6               |
| 9         | Leu                        | 3,3               |
| 10        | Lys                        | 2,8               |
| 11        | His                        | 3,3               |
| 12        | NH <sub>3</sub>            |                   |

zuzuordnen: Asparaginsre., Threonin, Serin, Glutaminsre., Glycin, Alanin, Isoleucin, Leucin, Histidin, Ammoniak.

Der nach dem Start zuerst auftretende, in Abb. Nr. 4 mit x bezeichnete Peak ließ sich zunächst nicht eindeutig einer Substanz zuordnen; er lag bei der später erfolgten Auftrennung durch das Durrumgerät im Absorptionsbereich von Taurin und Colaminphosphat.

Es fanden sich also Taurin, Colaminphosphat, Asparaginsre., Threonin, Serin, Glutaminsre., Glycin, Alanin, Isoleucin, Leucin, Histidin und Ammoniak.

In welchem Maße einige der gefundenen Aminosrn. als Bestandteile von Peptid A angesehen werden können, wird im Abschnitt D diskutiert werden.

### III. Versuche mit humanem Mischserum und Extrakten aus menschlichen Organen (Herz, Leber, M.Psoas)

#### 1. Filtration

Etwa je 10 ml Leber-, Psoas-, Herzextrakt und Mischserum unbekannter Konzentration wurden durch die Diaflo Membran UM 05 bei  $5 \text{ kg/cm}^2$  Überdruck filtriert. Der Vorgang dauerte jeweils 24 Stunden, der Überstand wurde alle 4 Stunden auf das Ausgangsvolumen mit Aqua dest. gebracht.

#### 2. Gefriertrocknung

Überstand und Filtrat wurden nach der in Punkt B, IV geschilderten Methode getrocknet. Serum-, Psoas- und Herzfiltrat ergaben eine weiße, das Leberfiltrat eine leicht bräunliche pulvrige Substanz, die in allen vier Fällen gut in Wasser löslich war.

#### 3. HE-phoretische Untersuchungen

Von den Filtraten wurden jeweils 1 ml 10 %ige Lösungen hergestellt. Davon wurden je 30  $\mu\text{l}$  Herz- und Psoasfiltrat und isoliertes Peptid A, Leber- und Serumfiltrat und isol. Peptid A auf je einem Pherogramm aufgetragen und bei pH 1,9, Spannung 6,5 kV 4 Stunden he-phoretisch aufgetrennt.

Eine Bande, die mit der des daneben aufgetragenen isol. Peptid A von der Auftraglinie gleich weit entfernt war und mit

dieser konfluerte, fand sich in den Filtraten von Herz, Psoas und Leber, jedoch nicht im Filtrat des humanen Mischserums.

Die dünnschichtchromatographische Kontrolle bestätigte mit einem einheitlichen Rf-Wert von 0,27 bei einer allerdings schwachen Darstellung der Leber-Bande das Vorkommen einer Substanz im Myocard, M. Psoas und in der Leber des Menschen, die sich hochspannungselektrophoretisch und dünnschichtchromatographisch wie Peptid A verhält.

## D. Diskussion

Aus dem niedermolekularen Kalbsherzextrakt, der in vorangegangenen gelchromatographischen Versuchen fraktioniert wurde, gelang es mit Hilfe der Hochspannungselektrophorese Peptid A mit hohem Reinheitsgrad zu isolieren. Die Kontrolle über die Reinheit von Peptid A und seine Identität mit der ursprünglich getrennten Substanz erfolgte mittels der Dünnschichtchromatographie und der HE.

Wird gewaschenes Filterpapier sehr guter Qualität bei sorgfältiger Präparation als Trägermaterial und zum Eluieren verwendet, fällt es aller Erfahrung nach als Quelle für Verunreinigungen aus.

Die Methode der Infrarotspektroskopie war zur Klärung der Identität von Peptid A geplant. Dies hätte vorausgesetzt, daß ein Spektrogramm mit den gleichen Absorptionsbanden, vor allem in der "fingerprint"-Region, von einer authentischen Substanz zum Vergleich mit Peptid A gefunden worden wäre. Dies war bei den verfügbaren IR-Spektrenkatalogen (Lit.Verz. Nr. 12, 13) und in den im Lit.Verz. (von Nr. 16 - 25) aufgeführten Arbeiten mit IR-Spektren von Peptiden nicht der Fall.

Immerhin konnte mit Hilfe der Banden, die von den Gerüstschwingungen von Peptid A im Wellenzahlbereich von  $4000\text{ cm}^{-1}$  -  $1500\text{ cm}^{-1}$  erzeugt wurden, die Peptidstruktur von Peptid A wahrscheinlich gemacht werden. Abweichungen der jeweils für eine funktionelle Gruppe bestimmten Banden um  $50\text{ cm}^{-1}$  vom standardisierten Bereich können durchaus als Folge spezieller molekularer Eigenschaften auftreten. So liegt die Absorptionsspitze der Carbonylabsorption bei  $1720\text{ cm}^{-1}$  um  $40\text{ cm}^{-1}$  und der Amid II-Absorpt. bei  $1590\text{ cm}^{-1}$  um  $20\text{ cm}^{-1}$  oberhalb der Norm.

Sutherland und Bellamy beschreiben, daß die genaue Lokalisierung der Amidbande I von der An- oder Abwesenheit irgendwelcher Substituenten am Stickstoff, von ihrer Elektro negativität, durch den Einbau der Amidgruppe in spannungsbehaftete Ringe und im Falle der zur Wasserstoffbrückenbindung befähigten Amide durch den physikalischen Zustand der Probe bei der Untersuchung bestimmt wird. Werden Wasserstoffbrückenbindungen aufgebrochen - dies geschieht u. a. auch bei längerer

Lagerung des Untersuchungsmaterials in einem Raum mit normaler relativen Luftfeuchtigkeit von ca. 40 % - erfolgt eine Verschiebung der Amid I Bande zu tieferen Frequenzen um  $40 - 60 \text{ cm}^{-1}$  (Williams, Fleming, Lit.Verz. Nr. 11). Als Frequenzbereich der Amid II Bande in N-monosubstituierten Amiden fanden Richardsen und Thompson für den festen Zustand  $1540 - 1570 \text{ cm}^{-1}$ . Wie bei Amid I erfolgt Verschiebung der Frequenz beim Übergang vom festen Zustand zu verdünnter Lösung unter Einflußnahme der Molekülstruktur.

In kompliziert gebauten Verbindungen, in denen die geometrischen Verhältnisse die volle Ausbildung von Wasserstoffbrücken in Kristallgittern verhindern können, sind die in Lösung beobachteten Verschiebungen klein; z. B. ändert sich die  $1515 \text{ cm}^{-1}$  Bande von festem Benzylpenicillin ihre Lage in Lösung nicht merklich.

Die Einflußnahme des Trägermediums KBr auf Bandenverschiebungen wird in der vorliegenden Literatur nicht beschrieben.

Die Frage der Beeinflussung der Frequenzen der einzelnen Banden durch die Partikelgröße der untersuchten Substanz, klärten Sharples und Gregory (Lit.Verz. Nr. 15) in einer vergleichenden Untersuchung mit Chloranil bei verschiedenen Trägermedien, unter anderem KBr. Bei einer Abweichung von  $\pm 4 \text{ cm}^{-1}$  hatten alle korrespondierenden Banden des Chloranils unabhängig von der Partikelgröße ( $12,2 \mu - 158,8 \mu$ ) nahezu dieselbe Frequenz.

Die Zusammensetzung des Peptids konnte nach dessen hydrolytischer Spaltung mit der Methode der Ionenaustauschchromatographie untersucht werden. Die dort gefundenen Bestandteile ergaben sich durch Vergleich mit den aufgetragenen Standardgemischen, was noch keinen Beweis ihrer Identität darstellt. Das Ergebnis läßt sich folgendermaßen interpretieren:

Der erste auf Abb. Nr. 4 mit x bezeichnete Peak ließ sich zunächst nicht eindeutig einer Substanz zuordnen. In diesen Bereich fallen die Extinktionskurven von Phosphoserin, Taurin, Colaminphosphat und Harnstoff. Erst die Analyse mit dem Durrumgerät führte zur Identifizierung von Taurin und Colaminphosphat bei fast gleichen Arealen in der Extinktionskurve.

Die übrige Analyse durch das Durrumgerät bestätigte das im folgenden diskutierte Multichromergebnis der einzelnen Aminosäuren, mit einer geringfügigen Verschiebung des Molekularverhältnisses zueinander. (Taurin und Colaminphosphat je 3 Teile - für x wurden 8 errechnet - für Asp. 2 statt 3 und Glycin 4 statt 3 Teile).

Die vom Rechner für die vom Multichromgerät gezeichneten Peaks angegebenen Flächeneinheiten besagen, daß die Fläche unter dem x Peak mit 34,6 % Anteil an der Gesamtfläche als größter Bestandteil des Hydrolysats registriert wurde.

Die restlichen 65,4 % fallen auf die Aminosäuren. Aus den Vergleichsubstanzen läßt sich errechnen, daß 200 Flächeneinheiten annähernd 5 nmol entsprechen. Demnach wurden im Chromatogramm 2 nmol Asp, 1 nmol Thre, 2 nmol Ser, 2 nmol Glu, 3 nmol Glyc, 1 nmol Ala und 7 nmol Subst. x aufgezeichnet. Asp : Thre : Ser : Glu : Glyc : Ala : Taurin : Col-Ph kämen dann im Molekülverhältnis 2 : 1 : 2 : 2 : 3 : 1 : 4 : 3 vor.

Leucin, Isoleucin, Lysin und Histidin wurden vom Schreiber als so kleine Peaks registriert, daß die Flächeninhalte darunter jeweils weniger als 1 nmol ausmachten. Mit ihrem geringen Gesamtanteil von 11,0 % (Leu 3,3 %, Isoleu 1,6 %, Lys 2,8 %, His 3,3 %) können diese Aminosäuren als Verunreinigungen gedeutet werden. Die Flächenanteile von Thre mit 5,9 % und Ala mit 6,0 % liegen nicht sehr viel darüber, entsprechen aber jeweils mindestens einem Nanomol.

Nimmt man für Peptid A ein Molekulargewicht von 600 an, so müßten, da nur 3/5 des Hydrolysats von 100 µg Substanz in den Analysator eingespritzt wurden, die Summe der Bestandteile 60 nmol ergeben. Die Aminosäuren und Subst. x ergeben rund 22 nmol, es fehlen also fast 2/3.

Eine Erklärung dafür bietet die Tatsache, daß bei der Hydrolyse mit Salzsäure Tryptophan gänzlich, Prolin, Thyrosin, Lysin und Asparaginsäure beträchtlich zersetzt werden. Das Vorkommen dieser Aminosäuren kann deshalb trotz ihrer Abwesenheit im Chromatogramm nicht ausgeschlossen werden; soweit sie aufgezeichnet sind, könnte ihr Anteil höher liegen, als aus der entsprechenden Kurve zu schließen wäre.

Der hohe  $\text{NH}_3$ -Gehalt des Hydrolysats ist auf Zersetzungs-  
vorgänge während der hydrolytischen Spaltung zurückzuführen.

Das von mir ermittelte Ergebnis der Analyse von Peptid A stimmt mit dem von H. Schmück in dem wesentlichen Punkt überein, daß auch damals "Peptid A" als Peptid erkannt wurde. Die Aminosrn. zeigen in ihrer Zusammensetzung gleichfalls teilweise Übereinstimmungen: Threonin fehlt bei H. Schmück, Leucin wurde nicht wie in unserer Analyse als Verunreinigung erkannt; Taurin, Asp, Glu, Ala, Glyc, Ser werden gemeinsam gefunden.

Mit dem Ergebnis der Hydrolysatanalyse von F. Haiß sind insofern Gemeinsamkeiten vorhanden, als dort eine rel. große Extinktionskurve in dem von uns zu Taurin und Colaminph. zugeordneten Bereich auftrat, die richtig als Colaminphosph. beschrieben wurde und im übrigen fast dieselben Aminosrn. bei wesentlich geringerem Gesamtanteil, x interessanterweise aber in ähnlichem Verhältnis zueinander gefunden wurden. So traten die in unserer Analyse als Verunreinigung gedeuteten Aminosäuren Ileu, Leu, Lys, und His mit jeweils 0,1 % Anteil, die bei uns als Bestandteile gewerteten Gly 13-fach (mit 1,35 %), Ser 9-fach (0,9 %), Glu 8-fach (0,8 %) stärker auf. F. Haiß mußte diese Aminosäuren bei nur 5,25 % Gesamtanteil als Verunreinigungen auslegen, es wäre jedoch unwahrscheinlicher Zufall, wenn diese "Verunreinigungen" zueinander in fast gleichem Verhältnis wie die von mir ermittelten Aminosäuren standen.

Die Peptidstruktur konnte auch durch die IR-Spektroskopie erhärtet werden.

Die Untersuchung auf das Vorkommen einer Peptid A entsprechenden Substanz in menschlichen Organen bestätigte, daß nicht nur im Herzmuskel, sondern auch im Skelettmuskel und, wegen der im Pherogramm schwach angefärbten Banden, in wahrscheinlich geringerer Konzentration in der Leber eine hochspannungselektrophoretisch und dünn-schichtchromatographisch sich wie Peptid A verhaltende Substanz vorkommt. In einer weiterführenden Untersuchung müßte kontrolliert werden, ob sich mittels Infrarotspektroskopie und Aminosäureanalyse auch Übereinstimmung mit dem Peptid A des Kalbsmyocards nachweisen läßt.

## Literaturangaben

1. Haib F. Isolierung einer ninhydrinpositiven, hydrolysierbaren Substanz aus dem Kalbsmyocard, Inaugural-Dissertation, München 1973
2. Schmück H. Ein Peptid aus dem niedermolekularen Extrakt eines Kalbsherzens, Inaugural-Dissertation, München 1972
3. Rothny K. Hochspannungselektrophoretische Untersuchungen der freien Aminosäuren des Kalbsherzens, Inaugural-Dissertation, München 1968
4. Donhauser S. Über ninhydrinpositive Bestandteile des Myocards, Inaugural-Dissertation, München 1968
5. Randerath K. Dünnschichtchromatographie, Weinheim/Bergstr. 1962
6. Rauen H. M. Biochemisches Taschenbuch, Band I u. II, Berlin 1964
7. Dèvényi T. Gergely J. Analytische Methoden zur Untersuchung von Aminosäuren, Peptiden und Proteinen (1-129, 172-258), Frankfurt/Main 1968
8. Bellamy L.G. Ultrarotspektrum und chemische Konstitution, Darmstadt 1955
9. Brügel W. Physik und Technik der Ultrarotstrahlung (322-338), Hannover 1961
10. Brügel W. Einführung in die Ultrarotspektroskopie (151-171, 274-292), Darmstadt 1962
11. Williams D.H. Fleming I. Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie (44-80), Stuttgart 1971
12. Grasselli J.G. Atlas of Spectral Dates and Physikal Constants for Organic Compounds (C 271-415), The Chemical Rubber, Cleveland, Ohio 1973
13. Pouchert C.J. The Aldrich Library of Infrared Spektra Milwaukee 1975
14. Clotten R.u.A. Hochspannungselektrophorese, Stuttgart 1962
15. Sharpless N.E. Gregory D.A. Physical State Influences on the Intensity of Infrared Absorption Bands. Journal Optic. Americ. Society 17,2 1962 (47-50)
16. Thompson H.W. Nicholson D.L. Short L.N. Infrared Spectra of Complex Molekules Disc. Faraday Society 9, 1950 (222-235)

### E. Zusammenfassung

Es gelang mit Hilfe der Hochspannungselektrophorese eine als Peptid A bezeichnete, ninhydrinpositive, hydrolysierbare Substanz, aus dem niedermolekularen Extrakt des Kalbsmyocards zu isolieren und mit der Dünnschichtchromatographie als zusätzliche Methode seine Einheitlichkeit zu kontrollieren.

In einigen menschlichen Organen - Herz, Skelettmuskel, Leber - wurde mit den gleichen Methoden eine dem Peptid A entsprechende elektrophoretische Bande gefunden.

Die Infrarotspektroskopie ermöglichte die Charakterisierung des "Peptid A" als ein Peptid und durch die Ionenaustauschchromatographie wurden seine Bestandteile bestimmt.

Die untersuchte Substanz ist demnach ein Peptid und setzt sich aus Asparaginsre., Threonin, Serin, Glutaminsre., Glycin, Alanin, Taurin und Colaminphosphat zusammen. Das Mol-Verhältnis beträgt angenähert etwa Asp:Threo:Ser:Glu:Gly:Ala:Taurin:Col-Ph=

2 : 1 : 2 : 2 : 3 : 1 : 4 : 3 .

17. Elliot A.  
Ambrose E.J. Evidence of Chain Folding in Polypeptides and Proteins  
Disc. Farad. Soc. 9, 1950 (246-250)
18. Hurt C.D.  
Bauer L.  
Klotz M. Infrared of Synthetic Polypeptides Prepared by the Lossen Rearrangement. Journal. Americ. Soc. 75, 1953 (624-627)
19. Blout E.R.  
Linsley S.J. Infrared Spectra and the Structure of Glycin and Leucine Peptides.  
Journal Americ. Soc. 74 1946 (1952)
20. Darmon S.E.  
Sutherland G. B.B. M. Infrared Spectra and Structure of Nature and Synthetic Polypeptides  
Journal Americ. Soc. 69, 1947 (2074)
21. Ambros E.J.  
Elliot A. Infrared Spectra and Structure of Fibrous proteins  
Proceeding of the Royal Society London 1951 (214-218)
22. Elliot A.  
Malcolm B.R. Infrared Spectra of Polypeptides Related to Silk  
Trans. Farad. Society 52, 1956 (528-533)
23. Sutherland G.B.B.M. The Structure of Amino-Acids, Polypeptides a. Proteins:  
Advances in Protein Chemistry 7, 1952 (293-315)
24. Busswell A.M.  
Rodebush W.H.  
Roy M.F. Infrared Absorption Studies Association in Acid Amides and Oximes.  
Journal Americ. Society 60, 1938 (2445-2449)
25. Blout E.R.  
Lenormant H. Infrared Spektreskopy of Biologic Materials in Aqueous Solutions  
Journal of the Optical Society of America 43, 1953 (1093-1095)



## Lebenslauf

Am 10. März 1947 wurde ich als Sohn des Ingenieurs Gheorghe Baran und dessen Ehefrau Luise, geborene Humpert, in München geboren.

Von 1953 bis 1957 besuchte ich in München die Volksschule an der Simmernstraße, ab September 1957 das humanistische Gymnasium der Benediktinerabtei Kloster Schäftlarn. Von dort wechselte ich 1964 nach der 10. Klasse in das Wilhelms-Gymnasium in München Über, wo ich 1968 die 13. Klasse mit der Reifeprüfung abschloß.

Von 1968 bis zum Sommersemester 1970 studierte ich an der naturwissenschaftlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität zu München Chemie und Biologie, ab Oktober 1970 an der medizinischen Fakultät Humanmedizin, wo ich im April 1971 das Vorphysikum, im Oktober 1973 das Physikum und im Dezember 1976 das medizinische Staatsexamen erfolgreich ablegte.

Aus meiner 1975 mit Frauke Baran, geborene Süchting, geschlossenen Ehe gingen 1975 und 1977 je eine Tochter hervor.

Die Approbation als Arzt wurde mir nach einjähriger Medizinal-assistentenzeit im Kreiskrankenhaus Altötting, in dessen Abteilung für Innere Medizin ich zur Zeit arbeite, im April 1978 erteilt.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Zöllner, daß ich in seiner Klinik arbeiten durfte, Herrn Prof. Dr. Nowy für das Überlassen des Themas und die allzeitige Hilfsbereitschaft bei der Durchführung der Versuche.

Herrn Prof. Dr. Fritz, Dr. Fink, Dr. Schießl und den übrigen Mitarbeitern des Instituts für klinische Chemie und klinische Biochemie der chirurgischen Klinik der Universität München gilt mein Dank für die Durchführung der Aminosäureanalyse.

Herrn Prof. Dr. Uhgi und Herrn Dr. Urban vom Institut für Organische Chemie der Technischen Universität München danke ich für ihren Rat bei der Auswertung der IR-Spektrogramme.







